УДК 595.78:591.113

А. А. Абдуллаев

МОДИФИКАЦИЯ ОКРАСКИ МАЗКОВ ДЛЯ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ГЕМОЛИМФЫ НАСЕКОМЫХ

Методика окрашивания мазков гемолимфы насекомых раствором азур-эозина по Романовскому имеет ряд недостатков: трудоемкость и недостаточная точность методов определения спиртовым раствором гематоксилина и установления соответствующей реакции дистиллированной воды; приобретение гемоцитами синих тонов и нечеткое окрашивание структуры ядра и цитоплазмы гемоцитов; изменение результата окрашивания гемоцитов при незначительном отклонении pH красящего раствора от оптимума; значительные затраты времени при окраске мазков на мостике, состоящем из двух стеклянных палочек, и в чашках Петри; необходимость приготовления свежего раствора краски для окрашивания каждой партии стекол в связи с выпадением ее в осадок, особенно при наличии следов щелочей; расход большого количества краски.

Мы попытались устранить эти недостатки подбором таких составных частей красящей смеси, которые обеспечивали бы равномерное и четкое окрашивание гемоцитов. Мы добились этого путем введения в красящую смесь веществ, предупреждающих выпадение осадка. Мы исследовали степень и качество окрашивания гемоцитов гусениц капустной белянки, капустной совки, непарного и кольчатого шелкопрядов азур-эозином по Романовскому при различных значениях pH среды с использованием ацетона и раствора фосфатных буферов. Для оценки преимуществ предлагаемой модификации по сравнению с известным методом произвели параллельное окрашивание мазков гемолимфы в растворе краски с применением дистиллированной воды, реакция которой близка к нейтральной. Во всех случаях тонкие мазки гемолимфы фиксировали в метиловом спирте в течение 3 мин. Мазки гемолимфы красили на мостике из двух стеклянных палочек. Кроме того, для одновременного окрашивания и промывания мазков гемолимфы, что важно в цитологических исследованиях, применяли специальные ванны для массового окрашивания мазков крови, используемые в гематологии.

Исследования показали, что применением буферного раствора достигается точная и неизменная реакция растворов краски Романовского. Для приготовления буферных растворов достаточно брать реактивы, которые имеют квалификацию «ХЧ». Буферную смесь фосфатов готовят из 0,1 М растворов дио- и монофосфата (расчет ведут по молекулярному весу солей). Для этого 14,2 г гидрофосфата натрия (Na_2HPO_4) разводят в 1 л дистиллированной воды. Монофосфата калия (KH_2PO_4) берется в количестве 13,6 г на 1 л воды. Для получения фосфатного буфера с pH 6,55 смешивают 20 мл 0,1 М Na_2HPO_4 и 30 мл 0,1 М KH_2PO_4, а для приготовления раствора с pH 7,0 берут 33,0 мл Na_2HPO_4 и 17,0 мл KH_2PO_4. Смешивают эти растворы перед окрашиванием мазков. Уменьшая количество Na_2HPO_4 до 3,0 мл и, соответственно, увеличивая KH_2PO_4 до 47,0 мл, достигают снижения pH буферной смеси до 5,53. При разбавлении буферной смеси дистиллированной водой в 10—20 раз величина pH буферного раствора не изменяется (значение pH растворов контролировали на pH-метре-340).

Для приготовления красящего раствора в чистую колбу (или химический стакан) емкостью 300—500 мл наливают 3 мл готовой краски азур-эозина по Романовскому, 3 мл ацетона, 25 мл раствора фосфатных буферов с pH 6,55 и 84 мл дистиллированной воды. Жидкость хорошо взбалтывают, и полученным раствором окрашивают мазки.

Для массовой окраски мазков гемолимфы приготовляют 250 мл раствора, выливают его в ванну, и заправленные в кассету стекла опускают на 3—5 минут при 21—25° в красящую смесь. Окрашенные мазки 3 раза промывают в дистиллированной воде, высушивают и исследуют под иммерсионным объективом микроскопа. При при-

менении буферных растворов красителей с pH 6,55 и ацетона можно окрашивать до 100—120 мазков гемолимфы (5—6 партий стекол), без замены красящей смеси. Получен хороший результат окрашивания мазков гемолимфы чешуекрылых через 24 часа после приготовления раствора краски.

Применение растворов краски с низкими значениями pH (pH 5,5) предотвращает выпадение осадка. Однако на мазках преобладают красные и розовые тона, которые часто не позволяют четко дифференцировать патологические и нормальные клетки.

Более четко окрашивается хроматин ядра и цитоплазмы гемоцитов при окраске мазков гемолимфы насекомых краской азур-эозина на фосфатном буфере с pH 6,55 в присутствии небольших количеств ацетона. Раствором краски азур-эозина на фосфатном буфере (pH 6,55) с добавлением ацетона мы пользовались в течении ряда лет для окрашиваний мазков гемолимфы и всегда получали хорошие результаты. При использовании такого раствора краски получается безукоризненная даже на мазках 5—6-й партии стекол, и, главное, всегда одинаковая окраска. Структура ядра гемоцитов проявляется чрезвычайно ясно, компактные хроматиновые зерна окрашиваются в темно-фиолетовый или фиолетово-красный цвет. Цитоплазма молодых клеток и эноцитоидов окрашивается в зависимости от возраста и физиологического состояния клеток в фиолетовый цвет различной плотности. Эноцитоидная зернистость приобретает интенсивный фиолетовый цвет, эозинофильные гранулы — темно-красные.

Применение этого метода позволяет четко определить ранние некробиотические изменения в гемоцитах, поскольку при этом обычный темно-фиолетовый цвет цитоплазмы азурофильных гемоцитов явно меняется на синий и четко выявляются вакуоли различных величин, а темно-красные хроматиновые зерна ядра становятся розовыми. Гранулы эозинофила, окруженные мембраной, распадаются на мелкие зерна («зернистое перерождение»), содержимое диффундируется из клетки и подвергаются вакуолизации. У таких гемоцитов, вслед за вакуолизацией цитоплазмы, обычно наблюдается цитолиз или хроматинолизис.

Агростанция УСХА

Поступила в редакцию
19.II 1979 г.

УДК 631.652.111

В. С. Михайлюков

ОРГАНИЗАЦИЯ МАССОВОГО ИЗГОТОВЛЕНИЯ ТОТАЛЬНЫХ ГЛИЦЕРИНОВЫХ ПРЕПАРАТОВ НЕМАТОД

При фаунистических исследованиях, испытании действия нематицидов на фитонематод различных видов приходится изготовлять сотни и даже тысячи тотальных препаратов нематод для определеня в дальнейшем их видовой принадлежности, изучения морфологических особенностей.

Мы изготовляли глицериновые препараты нематод, взяв за основу метод Сайнхорста (Seinhorst, 1959). Он заключается в том, что предварительно зафиксированные нематоды помещаются на 12 часов при температуре 35—40° С на часовые или предметные стекла с углублением в смесь 96%-ного этилового спирта, глицерина и дистиллированной воды в соотношении 20 : 1 : 79 (смесь I). Стекла помещаются в плотно закрытые банки, на дно которых налито некоторое количество спирта. В атмосфере, насыщенной парами спирта, испарение его со стекол замедляется, что положительно влияет на качество препаратов. Затем на стекла с нематодами наносится капля новой смеси глицерина со спиртом в соотношении 5 : 95 (смесь II). На этот раз они помещаются в частично прикрытые чашки Петри при температуре 40°. При этой температуре спирт полностью испаряется за 3 часа, и нематоды готовы к заделыванию в глицерин на постоянное хранение.